

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2003 年 8 月 14 日 (14.08.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/067254 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: G01N 33/02, C12Q 1/04 (72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 一色 賢司 (IS-SHIKI, Kenji) [JP/JP]; 〒305-8642 茨城県 つくば市 観音台 2 丁目 1 番地 1 2 独立行政法人 食品総合研究所内 Ibaraki (JP). 小川 順三 (OGAWA, Junzo) [JP/JP]; 〒262-0033 千葉県 千葉市 花見川区幕張本郷 7 丁目 1 0 番 1 9 号 Chiba (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP03/01222
- (22) 国際出願日: 2003 年 2 月 6 日 (06.02.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (74) 代理人: 中村 盛夫 (NAKAMURA, Morio); 〒104-0061 東京都 中央区 銀座 2 丁目 8 番 9 号 木挽館銀座ビル Tokyo (JP).
- (30) 優先権データ:  
特願2002-29270 2002 年 2 月 6 日 (06.02.2002) JP  
特願2002-168049 2002 年 6 月 10 日 (10.06.2002) JP
- (81) 指定国 (国内): JP, KR, US.
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人 食品総合研究所 (NATIONAL FOOD RESEARCH INSTITUTE) [JP/JP]; 〒305-8642 茨城県 つくば市 観音台 2 丁目 1 番地 1 2 Ibaraki (JP). 悠心技研株式会社 (YUSHIN GIKEN CO., LTD.) [JP/JP]; 〒262-0033 千葉県 千葉市 花見川区幕張本郷 7 丁目 1 0 番 1 9 号 Chiba (JP).
- (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書  
— 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受領の際には再公開される。

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF EVALUATING QUALITIES OF FOOD OR DRINK AND INDICATOR THEREFOR

(54) 発明の名称: 飲食品等の品質判定方法およびそのインジケータ

(57) Abstract: It is intended to provide a method of evaluating the qualities of a food, a drink or the like whereby the deterioration in the qualities (in particular, the freshness) of the food, drink or the like, i.e., the amount of microorganisms growing therein depending on temperature or with the passage of time can be conveniently and accurately detected to thereby evaluate the qualities thereof, and an indicator therefor. Namely, a food, a drink or the like is enclosed together with a fermentation base containing a gas-generating microorganism selected from among yeasts, fungi and bacteria in a sealed container made of a synthetic resin or a flexible film bag. Then the qualities of the food, etc. are evaluated depending on the amount of the gas generated accompanying the formation of an acid in the container (bag), and an indicator for the evaluation.

BEST AVAILABLE COPY

(57) 要約:

飲食品等の品質とくに鮮度の低下、即ち温度や時間の経過によって、飲食品等で増殖する微生物の量を、簡便かつ正確に検知してその品質を判定することのできる飲食品等の品質判定方法およびそのインジケータについて提供する。即ち、酵母、かびおよび細菌のいずれか一種からなるガス産性菌を含む発酵基材とともに、密閉された合成樹脂製の容器もしくは軟質フィルム袋内に封入し、その容器(袋)内に発生した炭水化物からの酸生成に伴うガスの発生量によって、該飲食品等の品質を判定すること、およびその判定のためのインジケータ。

WO 03/067254 A1



2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

## 明 細 書

## 飲食品等の品質判定方法およびそのインジケータ

## 5 技術分野

この発明は、農産物や畜産物、魚介類などの生鮮食品、弁当や惣菜などの加工食品、ジュースや酒などの飲料、ソースなどの調味料、ワクチンなどの薬剤、生化学用サンプル、化粧品などの物品についての品質、とくに環境温度や経過時間の影響によって起こる、これらの物品の変質や鮮度の低下を客観的に評価判定する方法およびこの方法に用いて有効なインジケータに関するものである。

## 背景技術

生鮮食品や加工食品、ジュースなどの飲料、ワクチン、血液等（以下、便宜上、これらを総称して「飲食品等」と略記して述べる）は、これらの安全性を確保するため、流通過程に保持された時間、即ち経過時間のみならず、その流通環境の温度履歴の管理が重要である。もし、環境温度や経過時間の管理を誤ると、例えば生鮮食品の場合は、変質（鮮度の低下）を招くだけでなく腐敗することがあり、さらには食中毒を発生する危険さもある。

こうした飲食品等の変質や腐敗は、その多くが、生産から流通を経て消費者に渡り、飲食に供されるまでの間に微生物が増殖することによって生じる。ところが、飲食品等の品質は、従来、該飲食品自体の腐敗に伴う異臭や変色、異味等を人の感覚によって主観的に判断するのが普通である。しかしながら、こうした主観的な判断には個人差があり、正しい品質（変質や腐敗の進行程度）を知ることが難しいのが実情である。

しかも、こうした飲食品等の品質低下は、たとえその飲食品等がチルド域（-5～5℃）またはクーリング域（5～10℃）に保存されていたとしても生じることがある。それは、実際の流通過程において、該飲食品等がどのような温度環境にあつ

たか、どのように取り扱われたかという条件、例えば、該飲食品等を保冷库に入れるまでの時間や、出し入れの回数などが異なるからである。とくに、該飲食品等の腐敗は、環境の温度が高ければ高い程、また保存時間が長くなるほど進行しやすくなる。このような背景の下で、従来より、流通過程における温度上昇や保存時間の経過に伴う飲食品等の品質低下を判断するためのインジケータの開発が強く求められてきた。

このような飲食品等の品質低下や異変等を判定するためのインジケータとしては、例えば、特開平 11-194053 号公報に開示された方法がある。この技術は、拡散性の染料が温度上昇と時間の経過により、染料拡散層に拡散浸透し、変色することによって温度履歴を確認する方法である。また、特開平 11-296086 号公報には、加熱温度と時間に依存して変色するインクを用いて、記号、図形または文字を飲食品の包装に直接印刷、または紙や樹脂シートに印刷したものを包装に貼付することによって飲食品の温度履歴を表示する方法が開示されている。しかしながら、これらの方法は、加熱温度と保持時間による微生物増殖の関係から、飲食品等の増殖の程度を推測する方法であり、実際にどの程度、微生物が増殖しているのかを客観的に判断することはできない。従って、実際の流通過程での飲食品等の取り扱いは、未だ高い品質を充分に保持している場合でさえも、危険を避けるために廃棄処分するのが普通で、非経済的であった。

本発明の目的は、従来技術が抱えている上述した問題に鑑み、飲食品等の品質が温度の変動および／または時間の経過によって変質する場合に、その変質の程度、すなわち鮮度の低下を、微生物の増殖の程度として視覚的に捉えられるようにすることにより、簡便かつ正確に判定することのできる、飲食品等の品質判定方法およびそのインジケータを提案することにある。

## 25 発明の開示

発明者らは、上記目的を実現するため、実際の流通食品中に含まれている食品由来の微生物に着目し、鋭意研究を重ねた。その結果、これらの微生物のうち、ガ

ス產生機能をもつガス產生菌が上記目的を実現するものとして有効であり、そのガス產生菌から発生したガス量によって飲食品等の品質（鮮度、変質の程度）を客観的（視覚的）に判定することが可能になるとの知見を得た。すなわち、本発明は、密閉された透明な合成樹脂製の容器もしくは透明な軟質フィルム袋内に、

5    ガスを発生する性質のある微生物、即ちガス產生菌を封入し、そのガス產生菌を含む基質（例えば、発酵基質）からのガス発生量によって被判定対象である飲食品等の品質を判定することを特徴とする飲食品等の品質判定方法である。

なお、上記ガス產生菌は、酵母、かびおよび細菌のいずれか一種であり、増殖開始温度以上の温度において、主に炭水化物からの酸生成に伴って  $\text{CO}_2$  と  $\text{H}_2$  を発生するものであり、そして、被判定食品等の成分とその食品由来の微生物（ガス

10    產生菌）を共に容器や袋内に封入したものであること、上記合成樹脂製の容器もしくは軟質フィルム袋の表面に、予め品質の程度を示す基準気泡径を印刷表示しておくこと、および上記基準気泡径は、腐敗危険期、注意期、安全期などに相当する気泡径の大きさを印刷表示したものであることが好ましい。

15    また、本発明は、密閉された透明な合成樹脂製の容器もしくは軟質フィルム袋内に、ガスを発生する性質のある微生物、即ちガス產生菌を培養液および／または培地からなる基質、例えば発酵基質とともに充填封入してなる飲食品等の品質判定用インジケータを提案する。

なお、本発明にかかるインジケータにおいて、上記ガス產生菌は、酵母、かび

20    および細菌のいずれか一種であり、ガス產生開始温度以上において、主に炭水化物からの酸生成に伴って  $\text{CO}_2$  と  $\text{H}_2$  を発生するものであること、被判定食品等に由来する微生物を望ましくはその飲食品等の成分とともに封入すること、上記合成樹脂製の容器もしくは軟質フィルム袋の表面に、予め品質の程度を示す基準気泡径を印刷表示したもの、および上記基準気泡径は、腐敗危険期、注意期、安全期

25    などに相当する気泡径の大きさを印刷表示したものであることが好ましい。

図面の簡単な説明

図1は、実験1-2における気泡径と時間との関係を示すグラフである。

図2は、実験1-2における気泡径の経時変化（環境温度：5℃）を示す写真である。

図3は、実験1-2における気泡径の経時変化（環境温度：23℃）を示す写真である。

図4は、実験2-1におけるガス発生量の経時変化（環境温度：23℃）を示す写真である。

#### 発明を実施するための最良の形態

10 本発明において重要な役割を担う微生物、とくに飲食品等の中でガス産生機能をもつ微生物について説明する。一般に、微生物は、飲食品の中にあつて、発酵と腐敗の働きを司っている。発酵とは、有用微生物およびそれらが作り出す酵素が有機物を代謝し、有用物質を生産する現象を言い、醸造や発酵食品（醤油、味噌等）などの分野で広く利用されている。これに対し、腐敗は、有害微生物（腐敗微生物）が飲食品中の炭水化物やタンパク質、脂肪などを分解する酵素を菌体外に分泌し、その分解生成物を栄養源として繁殖することによって生じる現象をいう。なお、この分解生成物（有機酸、アルデヒド、アンモニア等）が、腐敗臭や味の変質、変色等の原因になっている。

ところで、微生物のガス産生機能とは、前記のと通りの微生物が、代謝やつくり出す酵素によって飲食品中の有機物を分解する際に、分解生成物と共に  $\text{CO}_2$  や  $\text{H}_2$  などのガスを発生する機能を言い、該機能を有する微生物をガス産生菌と言う。このガス産生菌による有機物の分解は、ガス産生開始温度を超えたあたりから始まり、増殖したガス産生菌の1つ1つから少量のガスを徐々に発生する。なお、このガス産生開始温度は、ガス産生菌の種類や保存状態によっても異なるが、ほとんどのガス産生菌は1～10℃の範囲内にある。

なお、微生物とは、一般に顕微鏡でなければ観察することができないほどに小さな生物の総称で、酵母、かび、細菌などが含まれる。表1に主要な有機物発酵

の種類と発酵を行なう微生物、発酵に伴う主な微生物を示す。

【表 1】

	微生物	分解生成物
アルコール発酵	・酵母 (トルロフシス ( <i>Torulopsis</i> )、カンジダ ( <i>Candida</i> ) 属など) ・カビ ・一部の細菌 (ジモナス ( <i>Zymomonas</i> ) など)	エタノール、CO <sub>2</sub>
ヘテロ型乳酸発酵	・ロイノストック ( <i>Leuconostoc</i> ) およびラクトバチルス ( <i>Lactobacillus</i> ) の一部 (ロイノストック メセンテロイデス ( <i>Leu.mesenteroides</i> ) など)	乳酸、酢酸、ギ酸、エタノール、CO <sub>2</sub>
混合酸発酵	・イーコリ ( <i>E.coli</i> )、サルモネラ ( <i>Salmonella</i> )、エルウィニア ( <i>Erwinia</i> ) など	乳酸、エタノール、酢酸、H <sub>2</sub> 、CO <sub>2</sub> またはギ酸
ビフィズバクテリウム発酵	・クレブシエラ ( <i>Klebsiella</i> )、バシラス ポリミキシア ( <i>Bacillus polymyxa</i> ) など	2,3-ブチレングライコール、乳酸、エタノール、酢酸、H <sub>2</sub> 、CO <sub>2</sub> またはギ酸
酪酸およびブタノール・アセトン発酵	・クロストリジウム ( <i>Clostridium</i> ) の一部 ・バシラス マセランズ ( <i>Bacillus macerans</i> )	酪酸、酢酸、H <sub>2</sub> 、CO <sub>2</sub> 、ブタノール、エタノール、アセトン、イソプロパノール
プロピオン酸発酵	・プロピオンバクテリウム ( <i>Propionibacterium</i> ) とその近縁の嫌気性菌	プロピオン酸、酢酸、CO <sub>2</sub>

- 5 本発明は、このような微生物、特にガス産生菌のガス産生機能を利用して、飲
- 食品等の品質 (鮮度) を判定する方法、およびこの方法の実施に用いるインジケ
- ータについての提案である。上述したように、ガス産生菌による有機物分解反応、
- つまりガス産生反応は、飲食品が置かれている環境温度、および経過 (保存) 時
- 間によって徐々に行進するその他、水、酸素および栄養素の有無、pH 値などの影
- 響を受けることから、ガス産生菌を含む発酵基質 (試料液) を飲食品と同じ条件
- 10 に調整し、これを合成樹脂製の容器もしくは軟質フィルムをヒートシールして形

成した小袋内に充填封入してインジケータを作製し、さらに、このインジケータを飲食品と同じ環境下に置いて一緒に保存し、インジケータ内で発生したガスによる気泡の大きさの程度を判断することにより、飲食品等の品質を判定することができる。この場合、望ましくは被判定対象の飲食品由来のガス産生菌を前記小袋内に封入するとよいが、必ずしもそうしたガス産生菌に限定されるものではない。より望ましくは前記飲食品の成分をも基質として封入するとよい。しかし、基質とガス産生菌の相性があるので、これらの組み合わせは、被判定対象に合わせて選択することが好ましい。

本発明にかかる判定方法が、従来よりも優れている点は、本発明の場合、飲食品等の腐食の要因となる微生物による分解反応（ガス産生反応）と同じ反応を、前記小袋内で再現できるようにした点にある。たとえば、本発明にかかる上記インジケータを、流通過程におかれる飲食品と共に同じ環境下に保持しておくことで、その飲食品内での微生物による腐食反応の程度を、前記インジケータ内に直接的に再現することができ、しかもそれが視覚によって客観的に捉えることができるから、より正確な飲食品等の品質（鮮度、腐敗の進行程度等）を表示することができるようになる。

本発明の判定方法およびインジケータに用いるガス産生菌としては、表2に示す微生物のうちの一つ以上を用いることが好ましい。



【表2】

酵母	サッカロマイセス ( <i>Saccharomyces</i> ) 属
	ジゴサッカロマイセス ( <i>Zygosaccharomyces</i> ) 属
	トルラスポラ ( <i>Tbrulasporea</i> ) 属
	カンジダ ( <i>Candida</i> ) 属 など
カビ	アスペルギルス ( <i>Aspergillus</i> ) 属
	ペニシリウム ( <i>Penicillium</i> ) 属
	ムーコル ( <i>Mucor</i> ) 属 など
細菌	ロイコノストック ( <i>Leuconostoc</i> ) 属:
	ロイコノストック メゼンデロイデス ( <i>Leu.mesenteroides</i> )
	ロイコノストック パラメゼンデロイデス ( <i>Leu.paramesenteroides</i> )
	ロイコノストック ラクティス ( <i>Leu.lactis</i> )
	ロイコノストック オエノス ( <i>Leu.oenos</i> ) など
	ラクトバチルス ( <i>Lactobacillus</i> ) 属:
	ラクトバチルス ペントサス ( <i>L.pentosus</i> )
	ラクトバチルス スエビカス ( <i>L.suebicus</i> )
	ラクトバチルス コリノデス ( <i>L.collinodes</i> )
	ラクトバチルス ブチネリ ( <i>L.buchneri</i> )
	ラクトバチルス ブレビス ( <i>L.brevis</i> )
	ラクトバチルス ファーメンタム ( <i>L.fermentum</i> )
	ラクトバチルス ケフィール ( <i>L.kefir</i> )
	ラクトバチルス カンドレリ ( <i>L.kandleri</i> )
	ラクトバチルス コンフューサス ( <i>L.confuses</i> )
	ラクトバチルス サンフランシスコ ( <i>L.sanfrancisco</i> )
	ラクトバチルス マイナー ( <i>L.minor</i> )
	ラクトバチルス ハロトレランス ( <i>L.halotolerans</i> )
	ラクトバチルス ビリデセンス ( <i>L.viridescens</i> )
	ラクトバチルス フラクティボランス ( <i>L.fructivorans</i> )
	ラクトバチルス ラウテリ ( <i>L.reuteri</i> )
	ラクトバチルス オリス ( <i>L.oris</i> )
	ラクトバチルス ヒルガルディ ( <i>L.hilgardii</i> )
	ラクトバチルス バッシノステラカス ( <i>L.vaccinestercus</i> ) など
	ビフィドバクテリウム ( <i>Bifidobacterium</i> ) 属
	ビフィドバクテリウム シュードカテムラタム ( <i>B.pseudocatenulatum</i> )
	ビフィドバクテリウム デンチューム ( <i>B.dentium</i> )
	ビフィドバクテリウム アドレセンティス ( <i>B.adolescentis</i> )
	ビフィドバクテリウム アニマリス ( <i>B.animalis</i> )
	ビフィドバクテリウム ガリナラム ( <i>B.gallinarum</i> )
	ビフィドバクテリウム シュードロンガム ( <i>B.pseudolongum</i> )
	ビフィドバクテリウム ロンガム ( <i>B.longum</i> )
	ビフィドバクテリウム プロムラ ( <i>B.pullorum</i> )
	ビフィドバクテリウム カテニューラティム ( <i>B.catenulateum</i> )
	ビフィドバクテリウム アングラティム ( <i>B.angulatum</i> )
	ビフィドバクテリウム グロボサム ( <i>B.globosum</i> )
	ビフィドバクテリウム マグナム ( <i>B.magnum</i> )
	ビフィドバクテリウム コリネフォーム ( <i>B.coryneforme</i> )
	ビフィドバクテリウム アステロイデス ( <i>B.asteroids</i> )
	ビフィドバクテリウム サイス ( <i>B.suis</i> )
	ビフィドバクテリウム クニークリ ( <i>B.cuniculi</i> )
	ビフィドバクテリウム インファンティス ( <i>B.infantis</i> )
	ビフィドバクテリウム ブレーヴ ( <i>B.breve</i> )
	ビフィドバクテリウム インディカム ( <i>B.indicum</i> )
	ビフィドバクテリウム サブチル ( <i>B.subtile</i> )
	ビフィドバクテリウム サーモフィリウム ( <i>B.thermophilum</i> )
	ビフィドバクテリウム ボウム ( <i>B.boum</i> )
	ビフィドバクテリウム ミニナム ( <i>B.minimum</i> )
	ビフィドバクテリウム ビフィダム ( <i>B.bifidum</i> )
	ビフィドバクテリウム チョエリナム ( <i>B.choerinum</i> ) など

表2に示したガス産生菌のうち、本発明に係る判定方法への採用にあたっては、アスペルギルス属カビおよびラクトバシルス属細菌などがよく適合するが、とくに、サッカロマイセス属酵母を用いることが好ましい。なお、サッカロマイセス属酵母は、パンやビールの製造に、アスペルギルス属カビは、清酒の製造に、そして、ラクトバシルス属細菌は、ヨーグルトやチーズの製造に一般的に使用されている微生物であり、安心して使用することができる。

とくに前記のサッカロマイセス属酵母には、パン酵母、醸造酵母、飼料酵母および核酸原料酵母などがあり、醸造物のほか、一般に果汁、果皮、樹液のように糖密度の高い基質にも存在する。なお、パン酵母の代表的なものとしては、サッカロマイセス セルビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) があり、その中には、つくったパン生地を冷凍処理・冷蔵保存しても活性が失われない冷凍耐性酵母や冷蔵耐性酵母がある。一般的なパン酵母は4℃で発酵することもあるが、この冷蔵耐性酵母においては10℃で発酵するという特徴があり、また、冷凍耐性酵母は、冷凍による発酵能の低下を招きにくいという特徴を有する。

なお、酵母は、嫌気条件下においてアルコール発酵を行い、糖（グルコース）などの栄養分を分解して二酸化炭素とエタノールを生成する。一方、好気条件下において呼吸を行い、表3に示すような栄養源を含有する液内で、適当な温度：30℃前後およびpH：5～6の下で増殖していく。

20 【表3】

栄養源	
炭素源	有機炭素源：グルコース、フルクトース、サッカロース、マルトースなど
窒素源	無機窒素：アンモニウム塩 有機窒素：尿素、アミノ酸、ペプトン、酵母エキス など
無機塩	少量の無機塩が必要で、そのうち P、K、Mg、S は他の元素よりも多く必要。
生育因子	ビタミン B1、ビオチン、イノシトール、ニコチン酸アミド、パントテン酸およびピリドキシンなどを必要とするものがある。

次に、本発明に係るインジケータの作製方法について説明する。

まず、上記に示した微生物の少なくとも一種以上を、発酵基質である培養液お

よび／または発酵用培地と混合し、試料液を作製する。また、微生物と培養液および／または培地からなる発酵基質とは、別々に保管し、合成樹脂製の容器もしくは軟質フィルムの縦・横をヒールシールして形成される小袋中への充填に当たっては、その充填直前に両者を混合する。

- 5      なお、培養液の例としては、牛乳、肉エキス、果汁、野菜ジュースおよび発酵調味料などのいずれか一種以上のものが好適に用いられる。また、培地の例としては、ブドウなどの果物の糖分や野菜の糖分などが好適に用いられるが、これらは酵母がアルコールと炭酸ガスに代謝する現象があるために好適であり、その他、糖分の多いリンゴ、ジャガイモなども好適に用いられる。
- 10      上記のようにして作製したガス産生菌を種菌した試料液（発酵基質）を、合成樹脂製の透明な容器もしくは透明な軟質フィルムをヒールシールして形成される小袋内に内部が見えるように充填封入し、インジケータを作製する。この充填封入の方法は、特許第 2930515 号公報、特開 2001-335005 号公報および特開 2002-2601 号公報などに提案の液状物充填装置を用いて行なうが、その際、インジケータ内に空気が混入しないように注意することが肝要である。これは、本発明に係る方法が、インジケータ内に発生するガス量によって腐食の程度を判断する技術であるから、初めからインジケータ内に空気が混入すると、正確なガス発生量を確認することができなくなるからである。
- 15

- この意味において、本発明に用いる微生物としては、前記ガス産生菌のうち、
- 20      低酸素濃度でも生育できるような微好気生菌、通性嫌気生菌あるいは嫌気生菌であることが条件となる。

このようにして作製したガス産生菌を含む試料液を充填して封入したインジケータは、使用されるまでガス産生菌のガス産生開始温度以下、つまり 0℃以下の温度で冷蔵保存する。

- 25      また、本発明に適合する合成樹脂製の軟質フィルム袋としては、ポリエステル、ナイロン、ポリプロピレンなどのプラスチックフィルムを用いる。また、安全性を確保するため、前記フィルム袋のベースフィルムに二軸延伸ナイロン 25  $\mu\text{m}$  な

どの強度の高い材料を用いることができる。

- また、インジケータの表面には、対象となる飲食品等の種類やガス産生菌の種類に応じて、品質の指標となる基準気泡径を予め印刷表示しておくことが好ましい。この基準気泡径は、飲食品の危険期、注意期および安全期などに相当する気泡径の大きさを示したものであり、このように予め基準気泡径を印刷表示しておけば、食品の管理者がその都度、気泡径を測定する必要がなく、目視により品質（腐敗の進行程度）を容易に確認することができるという利点がある。

- なお、発明者らの研究によれば、小袋等の中に封入する菌はいずれの種類についても菌温度を変化させることにより、ガス発生時間は変化し、基盤、例えば、糖濃度を変化させることにより、最終ガス発生量は変化することがわかった。これらの性質を利用すれば、小袋内のガス発生時間と発生量を任意にコントロールし、用途に合った時間調整とガス発生後に破袋しない製品の製造が可能である。

## 実施例

### 15 <実施例 1>

微生物を含む様々な飲食品を用いて、保存時間および温度におけるガス産生反応の有無および気泡径を確認し、インジケータ用の試料液として最適な食品の選定を行なった。

（供試試料）

- 20 本実験に用いた基質（試料液）を表 4 に示す。

【表 4】

No.	製品種類	培養液、培養地
1	牛乳	牛乳中のたんぱく質 (原液)
2	はっ酵乳 1	牛乳中のたんぱく質 (原液)
3	はっ酵乳 2	牛乳中のたんぱく質 (原液)
4	ラクトアイス	牛乳中のたんぱく質 (原液)
5	乳製品：乳酸菌飲料	牛乳中のたんぱく質 (原液)
6	きぬ豆腐	大豆たんぱく質 (汁・豆腐)
7	米みそ	大豆たんぱく質 (原液・10 倍希釈)
8	塩漬 1	野菜中の糖分 (漬液)
9	塩漬 2	野菜中の糖分 (漬液)
10	塩漬 3	野菜中の糖分 (漬液)
11	醤油漬 1	野菜中の糖分 (漬液)
12	醤油漬 2	野菜中の糖分 (漬液)
13	たくあん漬	大根、米ぬかの糖分 (漬液)
14	酢漬	野菜中の糖分 (漬液)

## (実験用インジケータの作製)

NY<sup>15</sup>/XA-S<sup>50</sup> のラミネートフィルムを用いて作製した小袋中に、表 4 に示した各  
 5 製品を試料液として 2ml 充填した後、空気が混入しないようにヒールシートを施  
 して実験用インジケータを作製した。

## (実験 1-1)

前記各試料液を充填したインジケータ (小袋) を、25℃に設定した恒温槽内に  
 24 時間放置し、袋内のガス発生の有無を確認した。その結果を表 5 に示す。こ  
 10 れによれば、No.7~10 のインジケータにガスの発生が認められた。とくに、No.9  
 のインジケータでは、多量のガス発生が認められた。

【表 5】

No.	製品種類	ガス発生
1	牛乳	×
2	はっ酵乳 1	×
3	はっ酵乳 2	×
4	ラクトアイス	×
5	乳製品：乳酸菌飲料	△
6	きぬ豆腐 汁	×
	豆腐	×
7	米みそ 原液	△
	10 倍希釈	○
8	塩漬 1	○
9	塩漬 2	◎
10	塩漬 3	○
11	醤油漬 1	△
12	醤油漬 2	×
13	たくあん漬	×
14	酢漬	×

◎：ガス発生有（多） ○：ガス発生有 △：ガス発生有（極少） ×：ガス発生無

そこで、最も顕著なガス発生が認められた No.9 のインジケータを用いて、温度  
5 を変えて微生物のガス産生反応を確認した。

（実験 1－2）

実験用インジケータを 23℃に保った室内と、5℃の冷蔵庫中に 24 時間放置し、  
放置 14 時間後およびその後は、2 時間おきにインジケータ内に発生した気泡径を  
3 回ずつ測定した。その結果を表 6 および図 1 に示す。なお、図 1 は、3 回の測定  
10 結果の平均値を示したものである。また、各時間毎に撮影した写真を図 2 および  
図 3 に示す。

【表 6】

環境温度	5°C			23°C		
回数 保持時間	1	2	3	1	2	3
0 hr	0	0	0	0	0	0
14 hr	0	0	0	2.36	1.34	2.76
16 hr	0	0	0	4.2	2.71	3.62
18 hr	0	0	0	4.68	3.11	3.92
20 hr	0	0	0	4.93	3.55	4.21
22 hr	0	0	0	4.92	3.57	4.3
24 hr	0	0	0	6.69	3.89	5.52

- 実験 1 - 2 の結果から、5°C の環境下では、24 時間放置後も気泡の発生は認められず、低温ではガス産生菌による反応が進まないことがわかった。しかし、
- 5 23°C の環境下では、14~16 時間後にガスの発生が認められ、時間の経過に従って気泡径が大きくなっていることがわかる。

#### <実施例 2>

次に、本発明にかかるインジケータに使用するガス産生菌として、酵母の有効性を確認するため、以下のような実験を行なった。

#### 10 (実験用インジケータの作製)

まず、酵母 1g を蒸留水 1ml に懸濁させて酵母液を作製した。この酵母液 0.2ml と 5% グルコース溶液 10ml (培養液) とを混合して得た試料液を、Ny/VM-PET/XA-S のラミネートフィルムを用いて作製した小袋中に 1ml ずつ充填した後、空気が混入しないようにヒートシールを施して実験用インジケータを作製した。

#### 15 (実験 2 - 1)

- 前記のとおり作製した各インジケータ (小袋) を、23°C、10°C、4°C、2°C および 0.5°C に設定した恒温槽内にそれぞれ放置し、酵母によるアルコール発酵に伴い、試料液中のグルコースが分解され、CO<sub>2</sub> が発生するまでに要する時間を測定した。その結果を表 7 に示す。さらに、インジケータを 23°C 恒温槽中に 30 分、3 時間および 9 時間放置した際の写真を図 4 に示す。表 7 および図 4 の結果から、温度が高いほどアルコール発酵に要する時間が短くなり、23°C では、30 分経過後か
- 20

ら CO<sub>2</sub> が発生し始め、9 時間後には袋が破裂しそうな程に多量のガスが発生することが確認できた。

【表 7】

恒温槽温度	ガス発生に要した時間
23℃	30～60 分
10℃	4～5 時間
4℃	9～13 時間
2℃	64 時間
0.5℃	78～80 時間

## 5 (実験 2-2)

次に、ガス産生反応に伴う試料液の pH 値、糖濃度および生菌数の変化について調査した。前記のとおり作製した 3 種類のインジケータに対し、インジケータ作製直後と 23℃恒温槽に 24 時間放置後における試料液の pH 値、糖濃度および生菌数を測定した結果を表 8 に示す。

10 【表 8】

		pH	糖濃度(%)	生菌数 (CFU/ml)
インジケータ 1	インジケータ作製直後	3.94	5	$1.4 \times 10^8$
	23℃・24 時間放置後	3.38	2.5	—
インジケータ 2	インジケータ作製直後	4.06	5	$1.2 \times 10^8$
	23℃・24 時間放置後	3.37	2.3	$3.0 \times 10^7$
インジケータ 3	インジケータ作製直後	3.78	5	$1.2 \times 10^8$
	23℃・24 時間放置後	3.20	1.2	$5.8 \times 10^7$

表 8 の結果から、いずれのインジケータも 24 時間放置後の試料液の糖濃度および pH 値が、インジケータ作製直後と比較して低下していることがわかる。これは、酵母によるアルコール発酵により試料液中のグルコース（糖分）が分解され、その分解生成物として CO<sub>2</sub>（酸性）が生成されたことによる。また、生菌数はいずれも 24 時間放置により減少しているが、これは菌の栄養成分であるグルコース（糖分）が消費され、その結果、菌の代謝異常（栄養失調）が起きたためと思われる。

(実験 2-3)

さらに、前記のとおり作製した実験用インジケータ（小袋）を 24 時間、-2



2℃の冷凍庫で凍結させた後、解凍し、23℃、10℃および 4℃に設定した恒温槽内に放置してガス発生量およびアルコール発酵に要する時間を調査した。その結果を表 9 に示す。

【表 9】

単位：時間

5

恒温槽温度		発生量(+)*	発生量(++)*	発生量(+++)*
23℃	酵母 1	0.3	1.25	3
	酵母 2	0.5	1.75	3
10℃	酵母 1	4	6	—
	酵母 2	25	—	—
4℃	酵母 1	—	15 以内	87 以内
	酵母 2	135 以上	255 以内	—

\* (+)：やや発生、(++)：多量発生、(+++)：非常に発生

表 9 の結果から、いずれのインジケータにおいても凍結—解凍処理を行なわない場合（実験 2－1、表 7）と比較するとガス発生までに若干の時間を要するものの、ガス発生量については大きな変化が見られず、本実験で用いた酵母が冷凍による障害（発酵能の低下）を受けにくい（冷凍耐性酵母）ことが確認できた。このような酵母は、例えば、冷凍食品等のインジケータとしての適用が期待できる。

10 以上の実施例 1 の結果から、本発明にかかるインジケータを用いると、ガス発生までには時間がかかってしまうものの、少なくとも例示した漬物液（培養液：野菜の糖分）からなる試料液を用いたインジケータでは、食品の品質（腐敗の進行程度）を判定するときに極めて有望であることがわかった。また、本実験では使用しなかったが、その他にも未殺菌の食品（野菜や果物を含む）であれば、本発明のインジケータとして利用することができると考えられる。また、このよう

20 に市販の商品をそのままインジケータ用試料として使用しても良いし、ガス産生菌の種類と培養液（地）を検討することにより、温度、食品の種類に合わせて、様々なインジケータを提供することもできる。

また、以上の実施例 2 の結果からは、本発明に係るインジケータに適合するガ

ス産生菌として、酵母が好適に利用できることが確認できた。また、酵母はその種類によって発酵温度が異なることから、対象とする食品にあわせて適切に選択すれば、優れたインジケータになり得ることがわかった。

#### 5 産業上の利用可能性

- 以上説明したように、本発明に係る飲食品等の判定方法およびこの方法の実施に用いるインジケータによれば、飲食品等の品質、とくに温度履歴、経過時間の両方に依存して変質する程度（腐食の進行程度等）を、その飲食品の変質を小袋内に再現するような形で、より正確にかつ簡便に判定することができるようになる。
- 10 る。本発明において、飲食品等とは、農産物、畜産物、魚介類などの生鮮食品、弁当や惣菜などの加工食料品、野菜や果物のジュースあるいは酒などの飲料、ソースやみそなどの調味料、食料油、生化学用サンプル、化粧品、工業薬品、ワクチンなどの薬剤、血液、臓器、育畜用培地、種子その他の主として保存環境の温度や保存時間の影響を受けて変質したり、腐敗したりする物品を意味しており、
- 15 このような物品の品質を判定するのに有効である。

## 請求の範囲

- 1 密閉された透明な合成樹脂製の容器もしくは軟質フィルム袋内に、ガスを発生する性質のある微生物を基質と共に封入し、その容器内もしくは袋内に発生するガス量によって、飲食品等の被判定対象の品質を判定することを特徴とする飲食品等の品質判定方法。
- 2 上記のガスを発生する性質のある微生物がガス産生菌であることを特徴とする請求の範囲 1 に記載の飲食品等の品質判定方法。
- 3 上記ガス産生菌は、酵母、かびおよび細菌のいずれか一種であることを特徴とする請求の範囲 2 に記載の飲食品等の品質判定方法。
- 4 上記ガス産生菌は、ガス産生開始温度以上において、主に炭水化物からの酸生成に伴って  $\text{CO}_2$  と  $\text{H}_2$  を発生するものであることを特徴とする請求の範囲 2 または 3 に記載の飲食品等の品質判定方法。
- 5 上記合成樹脂製の容器もしくは軟質フィルム袋の表面に、予め品質の程度を示す基準気泡径を印刷表示しておくことを特徴とする請求の範囲 1 に記載の飲食品等の品質判定方法。
- 6 上記基準気泡径は、腐敗危険期、注意期、安全期などに相当する気泡径の大きさを印刷表示したものであることを特徴とする請求の範囲 5 に記載の飲食品等の品質判定方法。
- 7 被判定対象の飲食品等に由来する微生物を上記の容器や袋内に封入することを特徴とする請求の範囲 1 に記載の飲食品等の品質判定方法。
- 8 密閉された透明な合成樹脂製の容器もしくは透明な軟質フィルム袋内に、ガスを発生する性質のある微生物を基質とともに充填封入してなる飲食品等の品質判定用インジケータ。
- 9 上記のガスを発生する性質のある微生物が、ガス産生菌であり、基質がガス産生菌の培養液および／または培地であることを特徴とする請求の範囲 8 に記載の飲食品等の品質判定用インジケータ。

10 上記ガス産生菌は、酵母、かびおよび細菌のいずれか一種であることを特徴とする請求の範囲9に記載の飲食品等の品質判定用インジケータ。

11 上記ガス産生菌は、ガス産生開始温度以上において、主に炭水化物からの酸生成に伴って  $\text{CO}_2$  と  $\text{H}_2$  を発生するものであることを特徴とする請求の範囲9ま

5 たは10に記載の飲食品等の品質判定用インジケータ。

12 上記合成樹脂製の容器もしくは軟質フィルム袋の表面に、予め品質の程度を示す基準気泡径を印刷表示しておくことを特徴とする請求の範囲8に記載の飲食品等の品質判定用インジケータ。

10 13 上記基準気泡径は、腐敗危険期、注意期、安全期などに相当する気泡径の大きさを印刷表示したものであることを特徴とする請求の範囲12に記載の飲食品等の品質判定用インジケータ。

14 被判定対象の飲食品等に由来する微生物を上記の容器や袋内に封入したことを特徴とする請求の範囲8に記載の飲食品等の品質判定用インジケータ。

Fig.1

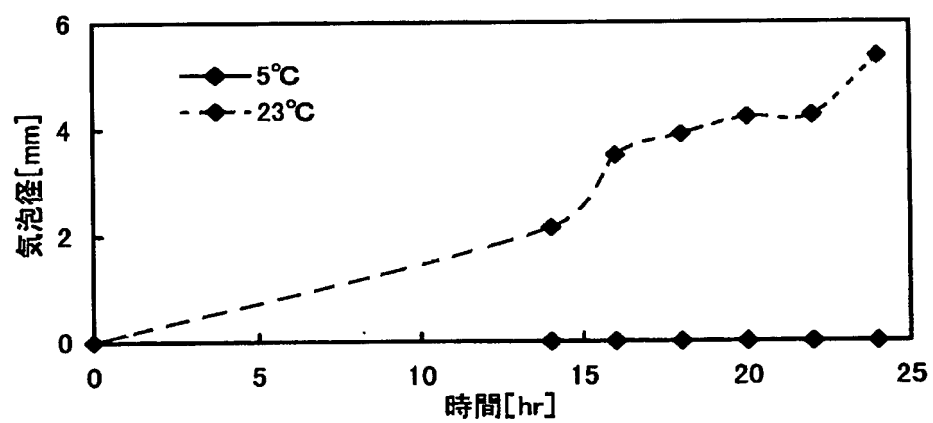
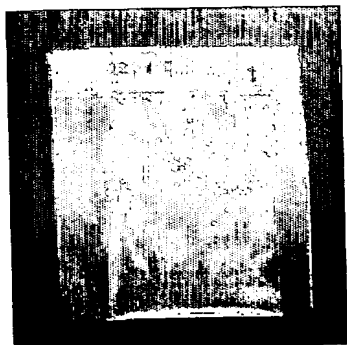


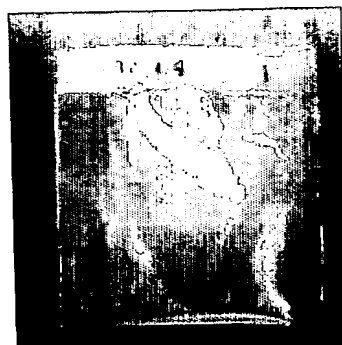
Fig.2



0hr



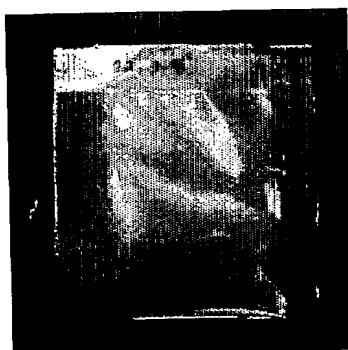
14hr



16hr



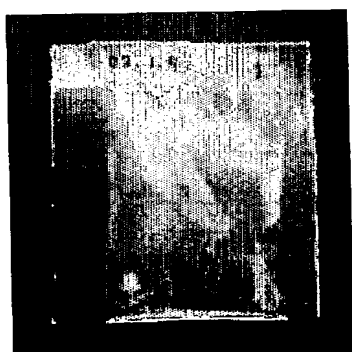
18hr



20hr

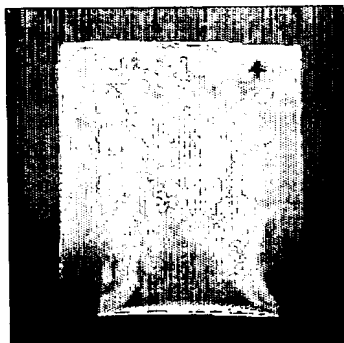


22hr

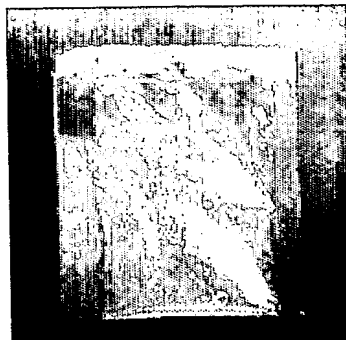


24hr

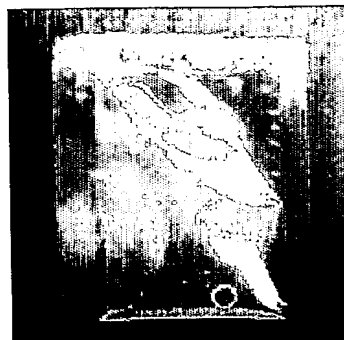
Fig.3



0hr



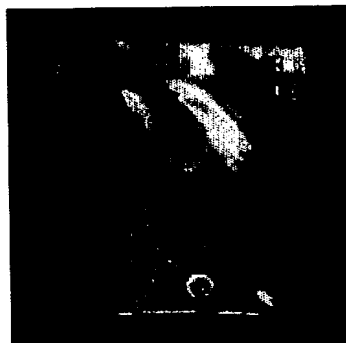
14hr



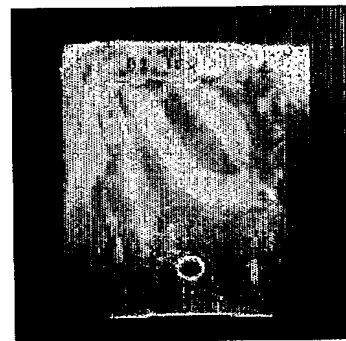
16hr



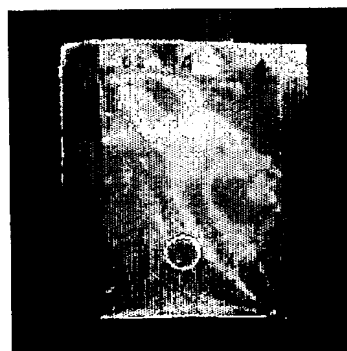
18hr



20hr

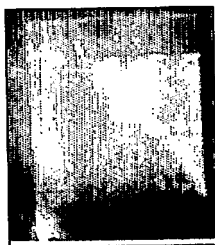


22hr

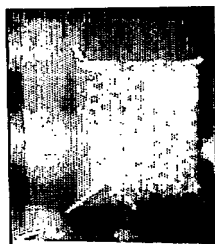


24hr

Fig.4



23°C 30 分  
(+)



23°C 3 時間  
(++)



23°C 9 時間  
(+++)

(+) : やや発生  
(++) : 多量発生  
(+++): 非常に発生



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/01222

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl<sup>7</sup> G01N33/02, C12Q1/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>7</sup> G01N33/02, C12Q1/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2003  
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2003 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2003

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 8-15251 A (Kabushiki Kaisha Advance), 19 January, 1996 (19.01.96), (Family: none)	1-14
A	JP 09-504858 A (California South Pacific Investors), 13 May, 1997 (13.05.97), & US 5306466 A & WO 94/27144 A & AU 6835394 A & DE 69421920 A & CA 2161435 A & NO 954604 A & FI 955572 A & EP 699304 A & CN 1123572 A & NZ 266717 A & ES 2141826 A & DK 699304 A	1-14

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
---	---

Date of the actual completion of the international search  
13 May, 2003 (13.05.03)

Date of mailing of the international search report  
03 June, 2003 (03.06.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> G01N33/02, C12Q1/04

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> G01N33/02, C12Q1/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2003年
日本国登録実用新案公報	1994-2003年
日本国実用新案登録公報	1996-2003年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 8-15251 A (株式会社アドバンス) 1996. 01. 19 ファミリーなし	1-14
A	JP 09-504858 A (カリフォルニア・サウス・パシフィック・インベスターズ) 1997. 5. 13 & US 5306466 A & WO 94/27144 A & AU 6835394 A & DE 69421920 A & CA 2161435 A & NO 954604 A & FI 955572 A & EP 699304 A	1-14

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13. 05. 03

国際調査報告の発送日

03.06.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)  
郵便番号100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

竹中 靖典



2 J 9507

電話番号 03-3581-1101 内線 3251



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**